

# Studies on eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) and formin involved in Tetrahymena cytokinesis

著者	武内 史英
内容記述	"January 2007"--Cover Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 4299, 2007.3.23 Includes bibliographical references (leaves 81-90)
発行年	2007
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/91346">http://hdl.handle.net/2241/91346</a>

【159】

氏 名 (本籍)	武 <sup>ぶ</sup> 内 <sup>ない</sup> 史 <sup>ふみ</sup> 英 <sup>ひで</sup> (茨 城 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4299 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Studies on Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A (eEF1A) and Formin Involved in <i>Tetrahymena</i> Cytokinesis</b> (テトラヒメナの細胞質分裂に関わる Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A (eEF1A) と Formin の研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治
副 査	筑波大学教授	理学博士	漆 原 秀 子
副 査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一
副 査	筑波大学助教授	理学博士	吉 村 建二郎

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

動物細胞の細胞質分裂では分裂面の膜直下にアクチンとミオシンから成る収縮環が形成される。収縮環はミオシンとアクチン繊維の相互作用により収縮し分裂溝を形成し、収縮環の収縮により細胞はくびり切られて2つの娘細胞に分けられる。繊毛虫テトラヒメナでは細胞質分裂の際、動物細胞と同様に収縮環が形成される。このとき収縮環形成に関与する多くの蛋白質が分裂面に局在し、収縮環の形成や収縮に関与している。しかし、収縮環の形成機構については未解明な部分が多い。そこで武内史英氏は分裂溝に局在するアクチン調節蛋白質がどのように収縮環形成に関与するのかを検証するために、アクチン繊維を束ねる因子であるペプチド伸長因子 1A (eEF1A) とアクチン繊維の重合を促進する Formin に着目した。

eEF1A は単量体アクチンと 1 : 1 で結合しアクチン繊維を束ねること、eEF1A は 2 量体を形成している可能性があること、eEF1A によるアクチン繊維の束形成は  $\text{Ca}^{2+}$  と CaM によって調節されていることが報告されている。しかし、eEF1A によるアクチン繊維束形成の調節機構については不明であった。そこで武内氏は eEF1A の単量体と二量体をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで分離して、それらのアクチン繊維への作用を共沈実験や電子顕微鏡観察を用いて検討した。その結果、単量体と二量体のアクチン繊維への結合の解離定数 (Kd) がそれぞれ  $0.9\mu\text{M}$  と  $1.2\mu\text{M}$  であり、アクチン繊維への結合力は等しいこと、単量体はアクチン繊維と結合するが繊維束を形成せず、二量体がアクチン繊維束を形成することが明らかになった。eEF1A によるアクチン繊維の束形成は  $\text{Ca}^{2+}$  と CaM によって調節されていることが明らかになっていくが、詳細は不明であった。eEF1A の 2 量体形成に対する  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の影響を共沈実験や電子顕微鏡観察によって調べ、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  が eEF1A の 2 量体形成を阻害して 2 量体を単量体にする、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  が eEF1A のアクチン繊維への結合を阻害することを明らかにした。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  の eEF1A に対するこれらの作用が  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  による eEF1A のアクチン繊維束形成阻害の実体である。また、これらの作用は  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートすることによって阻害されることが分かった。したがって、eEF1A 二量体によるアクチン繊維束形成は  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  によって可逆的に制御されていると結論した。分裂溝には  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  と eEF1A が共局在してい

るので、両者が収縮環のアクチン繊維束形成に関与していると考えられる。

Formin はアクチンの重合核形成を促し、プロフィリンと相互作用してアクチン重合を促進する蛋白質であり、細胞質分裂で重要な働きをされていると考えられている。プロフィリンは単量体アクチンに結合した ADP を ATP に交換する反応を促してアクチン重合を促進するが、アクチン繊維とは結合しない。収縮環形成における Formin の詳細な役割は不明であり、テトラヒメナでは Formin 様蛋白質は発見されていなかった。そこで武内氏はテトラヒメナより 2 種類の Formin 遺伝子、*BNI1* と *BNI2*, をクローニングし、それぞれの生化学的な性状と細胞分裂時の局在を調べた。*BNI1* の FH1 ドメインにはプロフィリンと特異的に結合するポリプロリン配列が存在し、この部分でプロフィリンと直接結合することが分かった。*BNI2* の FH1 ドメインにはポリプロリン配列がないのでプロフィリンとは結合しない。次に、*BNI1* と *BNI2* の部分配列を大腸菌で発現してこれらのペプチドに対する抗体を調製し、*BNI1* と *BNI2* の局在性を調べた。*BNI1* は細胞質分裂時に分裂溝でアクチンと共局在すること、収縮環が収縮するにつれて *BNI1* の分裂溝への局在が多くなることがわかった。プロフィリンも分裂溝に局在するので、*BNI1* はプロフィリンとアクチン繊維の間を仲介し、プロフィリンと共同して収縮環アクチン繊維の重合を調節していると考えられる。*BNI2* は分裂する小核に出現し、染色体と同じ挙動を示したので、*BNI2* は分裂中の小核で染色体の凝集や移動に関わっている可能性がある。

本研究はテトラヒメナの eEF1A によるアクチン繊維束形成のしくみを解明し、さらにテトラヒメナの 2 種類の Formin, *BNI1* と *BNI2*, の性状を明らかにしたものであり、細胞質分裂と小核分裂に新しい知見を加えたものである。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は 10 年近く議論のあった eEF1A によるアクチン繊維束形成のしくみを解明し、eEF1A が 2 量体を形成してアクチン繊維を束ねること、eEF1A によるアクチン繊維束形成が  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  によって可逆的に制御されていることを明快に証明した。さらに、テトラヒメナの 2 種類の Formin, *BNI1* と *BNI2*, がそれぞれ細胞質分裂と小核分裂に関与することを明らかにした。収縮環上でアクチンと共局在する *BNI1* の量が収縮環の収縮とともに増加することは収縮環アクチン繊維のターンオーバーに *BNI1* が関与することを示す初めての知見である。また、*BNI2* が小核分裂において染色体と同じ挙動を示したことは新発見であり、染色体凝縮や染色体分離をこ新しい知見を加えるものである。これらの新知見は、細胞質分裂や小核分裂の分子機構の解明に貢献するもので、学問的な価値が高いと判断される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。